

Isolasi Bakteri Endofit Asal Tanaman Tebu dan Potensinya sebagai Agens Biokontrol dan Pemacu Pertumbuhan

Isolation of Endophytic Bacteria from Sugarcane and Its Role as Biocontrol Agents and Plant Growth Inducer

Astri Afriani

Dosen Prodi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Samudra
Corresponding author: astriafriani19@gmail.com

ABSTRAK

Bakteri endofit banyak mendapat perhatian karena potensinya dalam memacu pertumbuhan dan kemampuannya dalam meningkatkan ketahanan tanaman terhadap penyakit dan hama tanaman. Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri endofit asal tanaman tebu dan menguji potensinya sebagai agens hayati untuk pengendalian penyakit dan pertumbuhan tanaman. Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan metode sterilisasi permukaan dengan alkohol 70% dan 0,1% HgCl_2 pada medium NA. Hasil isolasi kesepuluh bakteri tersebut adalah B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, dan B10. Tiga isolat yang menghasilkan zona bening 20 mm pada pengujian *in vitro* adalah B9, B7, dan B2. Hasil pengujian filtrat bakteri endofit B2 menghasilkan senyawa alkaloid dan terpenoid, B7 mengandung senyawa saponin, flavonoid, tannin dan terpenoid dan B9 mengandung senyawa alkaloid, tannin dan terpenoid. Hal ini mengindikasikan bahwa beberapa bakteri endofit asal tebu berpotensi sebagai agens biokontrol dan pemacu pertumbuhan tanaman.

Kata kunci: agens hayati, bakteri endofit, tebu,

ABSTRACT

Studies on endophytic bacteria has been increasing recently due to its potency to promote plant growth and induce plant tolerance to pests and diseases. The research was undergone to isolate endophytic bacteria from sugarcane followed by evaluation of their biocontrol and plant growth activities. Isolation of endophytic bacteria was based-on surface-sterilized method using alcohol 70% and 0,1% HgCl_2 on NA media. The result showed: 10 isolate endophytic bacteria had isolation were: B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, and B10. Three isolate had clear zone on petridish 20 mm *in vitro* testing is B9, B7, and B2. The results showed of endophytic bacteria filtrate test B2 produces alkaloid and terpenoid compounds, B7 contains saponin flavonoid, tannin and terpenoid compounds and B9 contains alkaloid, tannin and terpenoid compounds. This indicated that some of the endophytic bacteria have the potency as biocontrol agents and inducer of plant growth.

Key words: biocontrol agents, endophytic bacteria, sugarcane,

PENDAHULUAN

Tebu merupakan bahan baku utama pembuatan gula di Indonesia. Luas areal pertanaman tebu di Indonesia saat ini sesungguhnya hanya berkisar antara 340 – 350 ribu ha/tahun. Sekitar 70% dari areal pertanaman itu merupakan tebu rakyat (Malian *et al.*, 2004). Kebutuhan gula nasional meningkat setiap tahun akibat pertambahan penduduk, perbaikan pendapatan masyarakat, serta perkembangan industri makanan dan minuman. Laju peningkatan konsumsi gula diperkirakan sekitar 3.3 % per tahun (Mardianto *et al.*, 2005).

Penurunan produksi gula nasional beberapa tahun terakhir ini disebabkan oleh beberapa hal. Salah satunya karena penyakit. Rata – rata penurunan produksi gula karena serangan penyakit diperkirakan sekitar 10 % (BPPT, 2007). Di antara penyakit tanaman tersebut, penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas albilineans* L. merupakan penyakit yang sering dijumpai di pertanaman tebu.

Bakteri endofit merupakan mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (Tan & Zou 2001).

Pada tanaman tebu ditemukan mikroba endofit antara lain *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* sp., *Klebsiella* sp., dan *Pseudomonas* sp. Khusus untuk tanaman tebu *G. diazotrophicus* sudah banyak digunakan di perkebunan tebu di Brasil dan India. Populasi empat jenis bakteri selain berfungsi menyehatkan tebu, *G. diazotrophicus* juga dapat menambat

nitrogen dari udara. Begitu pula dengan *Azospirillum* sp. dan *Klebsiella* sp. Sedangkan *Pseudomonas* sp. berfungsi melarutkan fosfat. Bakteri penambat nitrogen tersebut juga mampu menghasilkan fitohormon Indole Acetic Acid (IAA), yang berfungsi sebagai hormon pertumbuhan (Widayati 2011).

Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri endofit asal tanaman tebu dan menguji potensinya sebagai agens hayati untuk pengendalian penyakit dan pertumbuhan tanaman jenis-jenis bakteri endofit yang terdapat pada tanaman tebu dan mengkarakterisasi jenis bakteri endofit yang terdapat pada tanaman tebu baik secara makroskopis dan mikroskopis.

BAHAN DAN METODA

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan dengan ketinggian tempat 25 m dpl.

Isolasi bakteri endofit dari tanaman tebu

Bakteri endofit diisolasi dari akar, batang, daun tanaman tebu yang sehat di areal pertanaman tebu asal PTPN II Sei Semayang. Sampel dimasukkan secara terpisah dalam kantung plastik dan dibawa ke laboratorium.

Isolasi Bakteri Endofit pada Media NA

Untuk mengisolasi bakteri endofit sampel ditimbang 1 gr, lalu dibersihkan dari kotoran yang melekat di bawah air mengalir, lalu dipotong dengan ukuran 2-3 cm. Setelah itu sampel direndam dengan alkohol 70% selama 30 detik, kemudian direndam dengan 0,1% HgCl₂ selama 3 menit dan dibilas dengan air steril 2-3 kali (Gagne *et al.* 1987).

Sampel digerus dengan mortal steril dan diberikan \pm 1ml air steril, lalu tambahkan 9 ml air steril sebagai pengenceran pertama, selanjutnya dilakukan pengenceran sampai 10⁻³.

Diambil 0,1 ml suspensi, kemudian plating pada media NA

Setiap koloni tunggal yang tumbuh direisolasi dan dibuat biakan murni, kemudian dikarakterisasi sesuai dengan uji standar seperti bentuk, warna serta uji gram (Schaad *et al.* 2001).

Uji Hipersensitif

Uji ini dilakukan untuk menentukan apakah isolat yang digunakan tergolong patogenik atau non patogenik terhadap tumbuhan. Uji dilakukan pada tanaman tembakau asal Balai BPTD Sampali. Tanaman dari pot tray dipindahkan dalam pot plastik yang telah berisi tanah dan disiram setiap hari, setelah tanaman tembakau berumur 1 minggu dilakukan pengujian. Pengujian dilakukan dengan cara gunting dicelup pada suspensi bakteri endofit (10^6 cfu/ml) kemudian gunting digunakan untuk menggunting daun tembakau muda (± 0.5 -2 cm). Perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Setelah itu dibungkus dengan plastik transparan dan diinkubasi pada suhu 24-26°C. Pengamatan dilakukan setiap hari, isolat yang patogenik akan menunjukkan gejala nekrotik pada daun yang digunting (Lelliot dan Stead, 1987).

Produksi metabolit bakteri endofit

Isolat bakteri endofit yang telah murni, ditumbuhkan dalam medium Nutrient Broth. Proses fermentasi bakteri endofit menggunakan medium Mueller-Hinton Broth (MHB). Media MHB biasa digunakan untuk mengetahui daya antibakteri dengan kandungan pepton (6 g), kasein (17,5 g), pati (1,5 g) dalam 1 liter air. Isolat yang diambil sebelumnya dipindahkan ke dalam 5 ml medium MHB. Kemudian dihomogenkan menggunakan tube stirrer hingga mencapai kekeruhan 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Suspensi koloni bakteri tersebut kemudian diambil sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf yang telah berisi 9 ml medium MHB. Eppendorf yang telah berisi

suspensi bakteri kemudian diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 30°C dan kecepatan 130 rpm. Setelah 2x24 jam, medium yang telah berisi suspensi bakteri kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dengan menggunakan mikro pipet steril dan dimasukkan ke dalam vial steril (Utami *et al.*, 2008).

Uji kandungan senyawa metabolit sekunder

Uji alkaloid

Sampel sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 5 tetes kloroform dan beberapa tetes Pereaksi Mayer (Pembuatan Pereaksi Mayer yaitu dengan satu gram KI dilarutkan dalam 20 ml aquades hingga larut kemudian larutan tersebut ditambahkan dengan HgCl₂ hingga larut). Adanya endapan putih menandakan adanya alkaloid.

Uji saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara, sebanyak 2 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan aquades. Campuran tersebut kemudian dikocok dengan kuat selama 10 menit. Terbentuknya busa atau buih menandakan adanya saponin.

Uji flavonoid

Sampel sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 1 gram bubuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

Uji tanin

Uji tanin dilakukan dengan memasukkan sebanyak 1 ml sampel ke dalam tabung reaksi. Sampel kemudian ditambahkan dengan FeCl₂ 5%. Adanya perubahan warna menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

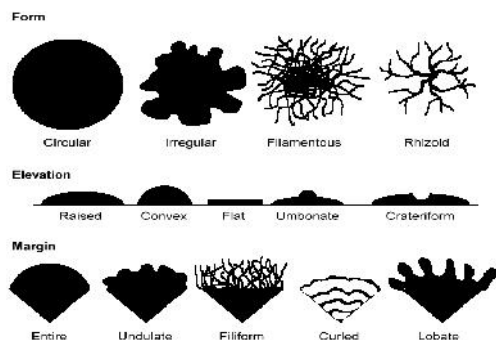
Uji terpenoid

Uji terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara, sebanyak 1 ml sampel ditambahkan dengan 1 ml CH₃COOH glasial dan 1 ml H₂SO₄ pekat.

Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

Karakterisasi Bakteri Endofit

Bakteri endofit yang didapat dikarakterisasi dengan melihat ciri makroskopis dan mikroskopis meliputi uji morfologi (Gambar 1), fisiologi dengan panduan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).



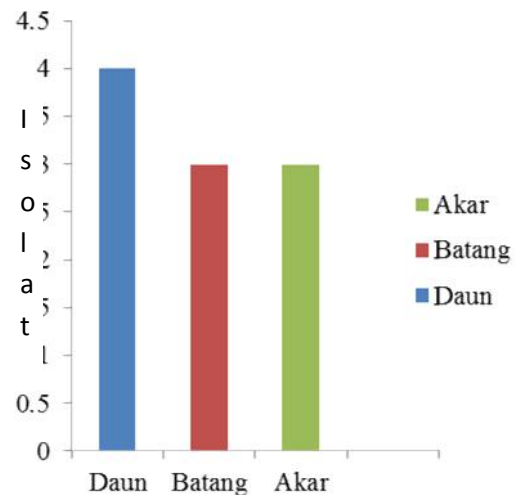
Gambar 1. Morfologi koloni bakteri

Sumber: <http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project>

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri endofit dari tanaman tebu

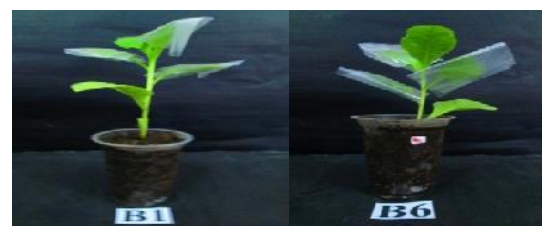
Dari hasil eksplorasi bakteri endofit dari tanaman tebu diperoleh 10 isolat bakteri endofit yaitu 4 isolat berasal dari daun tanaman tebu dengan kode isolat B1, B2, B3, dan B4, 3 isolat berasal dari batang tanaman tebu dengan kode B5, B6, dan B7 dan 3 isolat berasal dari akar tanaman tebu dengan kode isolat B8, B9 dan B10 (Gambar 2).



Gambar 2. Jumlah bakteri endofit terisolasi dari daun, batang dan akar tanaman tebu.

Uji hipersensitif

Hasil uji hipersensitif kesepuluh isolat bakteri endofit yang dilakukan pada tanaman tembakau diperoleh hasil yaitu respon hipersensitif menunjukkan tidak terdapat gejala penyakit pada tanaman tembakau (tanaman sehat). Jaringan daun tembakau yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri tetap terlihat sehat dan tidak menunjukkan adanya nekrotik pada tanaman tembakau setelah diinkubasi 7 hari (Gambar 3). Berdasarkan uji tersebut, diketahui bahwa, bakteri yang berhasil diisolasi dari akar, batang dan daun tanaman tebu tidak menimbulkan nekrotik pada daun tanaman tembakau (bersifat non patogenik).





Gambar 3. Uji hipersensitif pada daun tembakau setelah inkubasi 7 hari B1- B10

Karakterisasi Bakteri Endofit

Selanjutnya ke-10 isolat bakteri endofit tersebut diidentifikasi hasil selengkapnya adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Karakteristik bentuk morfologi koloni dan fisiologi bakteri endofit

Kode Isolat	Ciri koloni					
	Bentuk	Warna	Elevasi	Margin	Gram	Bentuk
B1	Tidak beraturan	Putih	Raised	Bergelombang	-	Basil/streptobacil
B2	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B3	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B4	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B5	Bulat	Kuning	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B6	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B7	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B8	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B9	Bulat	Putih	Raised	Entire	-	Basil/monobacil
B10	Tidak beraturan	Putih	rata	Bergelombang	-	Basil/monobacil

Dari hasil penelitian yang diperoleh bentuk umum mikroba terdiri dari satu sel (uniselluler), bentuk lain

berupa koloni yaitu gabungan dua sel atau lebih di dalam satu ruang. Bentuk ini merupakan ciri khas bagi suatu spesies tertentu. Variasi bentuk pada sel bakteri adalah bulat (kokus), batang/ bulat memanjang (basil) dan lengkung. Variasi bentuk yang kerap terjadi baik secara tetap ataupun sebagai bentuk kelainan karena pengaruh lingkungan. Bentuk bakteri juga dapat dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu. Bahkan akibat pengaruh lingkungan yang tidak menguntungkan, faktor makanan, dan suhu, bakteri dapat mengalami bentuk involusi yaitu bentuk sementara yang terjadi karena lingkungan yang menguntungkan (Ilyas 2001).

Menurut Lay (1994), pewarnaan gram berguna untuk membedakan gram positif dan gram negatif. Perbedaan hasil pewarnaan disebabkan oleh adanya perbedaan struktur kedua kelompok bakteri tersebut sehingga menyebabkan perbedaan reaksi dalam permeabilitas zat warna dan penambahan larutan pemucat. Sebagian besar dinding sel bakteri gram negatif terdiri dari kandungan lipida yang tinggi dibandingkan gram positif.

Bakteri endofit mencegah perkembangan penyakit karena memproduksi siderofor (Kloepper *et al.*, 1980), menghasilkan senyawa metabolit yang bersifat racun bagi patogen (Schnider-Keel *et al.*, 2000), atau terjadinya kompetisi ruang dan nutrisi (Kloepper *et al.*, 1999). Bakteri endofit juga memiliki kemampuan untuk mereduksi produksi toksin yang dihasilkan oleh patogen sehingga tidak patogenik terhadap tanaman atau menginduksi ketahanan tanaman terhadap serangan patogen (M'Piga *et al.*, 1997). Sturz *et al.* (2000) menyatakan bahwa ada bakteri endofit yang memiliki potensi mengurangi efek penyakit yang polisiklik dengan cara memperlambat laju perkembangan penyakit.

Bakteri endofit mempunyai prospek yang baik sebagai agensia hayati,

baik untuk serangga hama maupun untuk patogen penyebab penyakit tanaman karena mereka tidak harus bersaing dalam ekosistem yang baru dan kompleks. Kelebihan lainnya, terkadang endofit juga mampu sebagai perangsang tumbuh, pemicu inang untuk memproduksi fitoaleksin, bertahan dalam kondisi stres. Perkembangan penyakit dapat dihambat oleh endofit karena adanya siderofor atau senyawa metabolit yang beracun bagi patogen, atau terjadinya kompetisi ruang dan nutrisi, mereduksi produksi toksin yang dihasilkan oleh patogen sehingga tidak patogenik terhadap tanaman atau menginduksi ketahanan tanaman terhadap serangan patogen. Pengendalian patogen oleh bakteri endofit dapat melalui anticendawan atau antibakteri, siderofor, kompetisi terhadap nutrisi, menginduksi ketahanan tanaman secara sistemis atau meningkatkan ketersediaan hara tanaman (Sturz *et al.*, 2000; Sessitsch *et al.*, 2004).

Uji kandungan senyawa metabolit sekunder

Ketiga bakteri endofit (B9, B7, dan B2) yang telah ditapis dengan uji aktifitas antagonismenya (zona bening yang dihasilkan bakteri endofit 20mm) di laboratorium kemudian dimasukkan ke dalam medium kultur filtrat. Filtrat kemudian diuji kandungan kimianya dengan metode hidrolisis bahan kimia dan pemisahan senyawa aktif. Hasil pemeriksaan antara lain:

Tabel 2. Uji kandungan kimia dengan metode hidrolisis bahan kimia dan pemisahan senyawa

Uji	B2	B7	B9
Alkaloid	+	-	+
Saponin	-	+	-
Flavonoid	-	+	-
Tannin	-	+	+
Terpenoid	+	+	+

Hasil pengujian filtrat bakteri endofit B2 menghasilkan senyawa alkaloid dan terpenoid, B7 mengandung senyawa saponin, flavonoid, tannin dan terpenoid dan B9 mengandung senyawa alkaloid, tannin dan terpenoid. Berdasarkan hasil dari penelitian diduga bahwa bakteri endofit B2 termasuk ke dalam genus *Agrobacterium* spp, bakteri endofit B7 termasuk ke dalam genus *Alcaligenes* spp, dan bakteri endofit B9 termasuk ke dalam genus *Pseudomonas* sp. Hal ini sesuai dengan pernyataan Dexa Medica (2009) yang menyatakan *Agrobacterium* spp. menghasilkan alkaloid dan terpenoid yang berfungsi untuk menghambat penyebaran patogen tular tanah dan berfungsi sebagai penolak pertumbuhan pada sebagian bakteri gram negatif dan perusak jaringan tubuh, bakteri *Alcaligenes* spp. menghasilkan metabolit sekunder golongan tannin dan terpenoid yang dapat meningkatkan induksi dan ketahanan sel terhadap penetrasi berbagai patogen tular tanah dan *Pseudomonas* sp. menghasilkan senyawa turunan berupa alkaloid, tannin dan terpenoid.

KESIMPULAN

Tiga isolat yang menghasilkan zona bening 20 mm pada pengujian *in vitro* adalah B9, B7, dan B2. Hasil pengujian filtrat bakteri endofit B2 menghasilkan senyawa alkaloid dan terpenoid, B7 mengandung senyawa saponin, flavonoid, tannin dan terpenoid dan B9 mengandung senyawa alkaloid, tannin dan terpenoid.

DAFTAR PUSTAKA

- BPPT. 2007. Melihat Industri Gula Indonesia Dari Waktu ke Waktu. Diakses dari http://lc.bppt.go.id/ipitek/index2.php?option=com_content&do

- Dexa Medica. 2010. Bahaya Resistensi Antibiotika. Jurnal farmakologi dan kesehatan. 2(3):7-8pp
- Gagne S., Richard C., Roussean H & Antoun. 1987. Xylem- Residing Bacteria in Alfalfa Roots. Can J. Microbial. 33 : 996-1000.
- Holt JG, Krieg NR & Sneath PHA. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th.edition. Williams & Wilkins. Baltimore. 230-356pp. Quang Hung & Annapurna K. (2004). Isolation and characterization of endophytic bacteria in Soybean (*Glycine* Sp.). Omonrice 12: 92-101pp.
- Ilyas S. 2001. Mikrobiologi Dasar. Diktat Kompilasi, Universitas Sumatera Utara Press, Medan. p 28.
- Kloepper, Wong, P.T.W., & Baker, R. 1980. Suppression of wheat take-all and Ophiobolus patch by fluorescent pseudomonads from a Fusarium-suppressive soil. Soil , Biol. Bichem.
- Kloepper. 1999. Resistance genes in agricultural ecosystems. *J. microbiol. Meth.*,86, 150–155pp.
- Lay BW. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Edisi pertama, Cetakan pertama. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Lelliott RA & Stead DE. 1987. Methodes For The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plant. Oxford: Blacwell scientific publications .23-56pp.
- Malian, A.H., Ariani, M., Indraningsih, K.S., Zakaria, A.K., Askin, A. dan Hestina, A. 2004. *Revitalisasi Sistem dan Usaha Agribisnis Gula; Laporan Akhir*. Puslitbang Sosial Ekonomi Pertanian, Bogor.
- Mardianto, S., Simatupang, P., Hadi, P.U., Malian, H., dan Susmiadi, A. 2005. Peta jalan (road map) dan kebijakan pengembangan gula nasional. Forum penelitian Agro Ekonomi 23 (1): 19-37.
- M'Piga P., Bélanger RR., Paulitz TC & Benhamou N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28, Physiological and Molecular Plant Pathology 50: 301–320.
- Schaad NW., Jones JB & Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, St Paul, Minnesota : Aps Press.
- Sessitsch A., Reiter B & Berg G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Can. J. Microbiol* 50:239-249.
- Sturz AV., Christie BR & Nowak J. 2000. Bacterial Endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production, Critical Reviews in Plant Sciences 19:1–30.
- Tan RX & WX Zou. 2001. Endophytes : a rich source of functional metabolites. *Nat Prod. Rep.* 18 : 448-459pp.
- Utami U, Soemarno, Sumarno, & Yenny R. 2008. Aktivitas Anti Bakteri Endofit Tanaman Mangrove terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Jurnal Penelitian Perikanan. Vol. 11. nomor 1. 42-48p.
- Widayati WE. 2011. Bakteri Endofit Khusus Tebu dapat Meningkatkan Kadar dan Bobot Gula. *Artikel Produksi gula*. Lampung. 12-23pp.